

文章编号: 1000-3142(2000)01-0042-05

## 外部因子对蝴蝶兰叶片原球茎状体发生的影响

杨美纯, 周歧伟, 许鸿源, 卢美英

S682.310.3

(广西大学农学院, 广西南宁 530005)

**摘要:** 对影响蝴蝶兰叶片原球茎状体(PLB, Protocorm-like-body)发生和植株再生的外部因子进行了研究。结果表明:BA 是决定原球茎状体发生的主要因子;苹果汁、香蕉汁和椰子汁明显促进原球茎状体的形成;在 MS+BA 5 mg/L+椰子汁 15% 的培养基中,蝴蝶兰叶片原球茎状体的诱导率可达 60% 以上;活性炭可有效防止外植体叶块变褐死亡;多效唑 1.5 mg/L 可促进再生植株根的形成,使叶片变厚变短变绿,使试管苗移栽成活率达 95% 以上。

**关键词:** 蝴蝶兰; 组织培养; 原球茎状体; 植株再生; BA。

**中图分类号:** Q949.71<sup>+</sup>430.31 **文献标识码:** A

## Effect of external factors on protocorm-like-body inducement in *Phalaenopsis* leaves

YANG Mei-chun, ZHOU Qi-wei, XU Hong-yuan, LU Mei-ying

(Agricultural College, Guangxi University, Nanning 530005, China)

**Abstract:** The effect of external factors on protocorm-like-body(PLB) inducement and plant regeneration in *Phalaenopsis* were studied. The results indicated that BA was the most important external factor for determining PLB development; Apple juice, banana juice and coconut juice promoted PLB inducement; when BA 5 mg/L and 15% coconut juice were added into MS medium, the inducing rate of the PLB from leaves was more than 60%. Active carbon was effective for preventing the explant from browning and dying. MET 1.5 mg/L promoted the development of regenerated plant root, and the survival rate of transplants was more than 95%.

**Key words:** *Phalaenopsis*; tissue culture; protocorm-like-body; plant regeneration

蝴蝶兰(*Phalaenopsis*)花形奇特,色彩艳丽,花期持久,具有很高的观赏价值,在国内外花卉市场上极受欢迎。原产于热带和亚热带的蝴蝶兰适宜在广西南宁一带种植,在广西有很好的开发前景,但由于蝴蝶兰的种苗来源极少,因此制约了广西蝴蝶兰的工厂化生产。兰科植物种子非常细小,不含有为种子萌发提供营养的胚乳或其它组织,在自然条件下很难萌发,靠自然分株繁殖则增殖系数很低<sup>1</sup>。在花卉市场日趋繁荣的今天,组织培养是为工厂化生产兰花提供

收稿日期: 1999-03-29

作者简介: 杨美纯(1951-),女,副教授,从事植物生理学、植物组织培养的教学和研究工作。

种苗的主要手段,因此研究国内外流行畅销的蝴蝶兰品种的快速繁殖十分必要。

关于蝴蝶兰原球茎状体发生的研究,近年来国内外都有过报道<sup>[2-6]</sup>,这些研究中,以茎尖为外植体诱导原球茎状体发生则诱导率较高,而以叶片为外植体则诱导率较低,一般不高于20%。从1995年起,我们开始进行提高蝴蝶兰叶片原球茎状体诱导率的研究,经过多批实验,使叶片原球茎状体诱导率达60%以上。本文报告培养基成分等外部因子对蝴蝶兰原球茎状体发生和植株再生的影响。

## 1 材料与方 法

**1.1 材料** 从台湾引进的粉红瓣带紫色条纹,红唇的蝴蝶兰(*P. abendrot* × Freed Shenk)的盆栽苗,以及以花梗侧芽为外植体培养的无菌苗。

**1.2 方法** 取盆栽小苗叶片用10%的次氯酸钠溶液作常规灭菌,然后和无菌苗叶片分别切成约1 cm × 1 cm的小块作为外植体,把两种叶块上表面朝上分别平放于各组培养基上培养,每组培养基共接入每种材料各100块,2个月后统计原球茎状体诱导率。培养温度25~28℃,每日光照12 h,光照强度1 800~2 000 lx。

## 2 结果与分析

### 2.1 原球茎状体的产生、增殖及植株再生

在MS+BA 5 mg/L+椰子汁15%处理组中,外植体叶块接入培养基后10 d,即发现部分叶块切口边缘有少量直径约1 mm的黄绿色原球茎状体颗粒出现,接种后30 d,除叶块切口处长满原球茎状体外,有些叶块上表面也有很多单个或丛生的原球茎状体长出。其它处理组的外植体在接种20 d后也开始陆续在切口处形成原球茎状体。原球茎状体发生于外植体切口或叶上表面的浅层细胞,用镊子轻轻拨动即可使原球茎状体与外植体分离。

原球茎状体形成后1个月,把单个或丛生的原球茎状体从外植体上分离下来,转移到新鲜的MS+BA 5 mg/L+椰汁15%的培养基中,1个月后,在接入的原球茎状体周围有成团的第二代原球茎状体产生,增殖倍数可达数十倍。

把肉眼可见具有1~2片叶原基的原球茎状体转入MS+香蕉汁15%的培养基中,3个月后可长成具3张以上叶片、4条以上粗根的小苗。

表1 基本培养基和BA对蝴蝶兰叶片原球茎状体产生的影响  
Table 1 Effect of basic medium and BA on PLB formation in *Phalaenopsis* leaves

基本培养基 Basic medium	BA (mg/L)	外植体数 No. of explants	产生原球茎状体的 外植体数 No. of explants pro- ducing PLB(60 d)	诱导率(%) Induction rate (60 d)
Kyoto	0	96	0	0
Kyoto	5	97	12	12.2
KC	0	96	0	0
KC	5	100	13	13
MS	0	100	0	0
MS	1	100	5	5
MS	3	96	8	8.3
MS	5	100	18	18
MS	7	94	17	18.1
MS	9	96	17	17.7

### 2.2 基本培养基和BA对蝴蝶兰原球茎状体产生的影响

从表1可知,BA是决定蝴蝶兰原球茎状体能否产生的重要因素,在不加BA的情况下,3种基本培养基均不能诱导原球茎状体的产生,在加入BA 5 mg/L的3种基本培养基中,MS组的原球茎状体诱导率最高,且以后原球茎状体的生长发育也很好。

在MS附加不同浓度BA的各组培养基中,BA 1 mg/L和BA 3 mg/L两组的原球茎状体诱导率都不高,而且每个外植体叶块上产生的原球茎状体数也较少,但原球茎状体颗粒较大,直径为2~3 mm,以后都能发育成具根、叶的正常小苗。其余3组原球茎状体诱导率均较高,各处理组间差异不大,BA 7 mg/L和BA 9 mg/L 2组中每个外植体上产生的原球茎状体数量多,但颗粒较小,直径一般在1 mm以下,若2个月后不及时转入无BA的培养基中,则多数原球茎状体玻璃化,最后变褐死亡。在本实验条件下,MS附加BA 5 mg/L处理能获得较高的原球茎状体诱导率,又能使原球茎状体进一步的生长发育正常。

### 2.3 果汁对蝴蝶兰叶片原球茎状体产生的影响

表2所示在没有BA的情况下,MS培养基中分别加入3种果汁都不能诱导原球茎状体的产生,但在MS+BA 5 mg/L的培养基中分别加入3种果汁,都可使原球茎状体诱导率比表1所示的18%有明显提高,其中加椰汁组的诱导率最高,而且每个外植体叶块上产生的原球茎状体颗粒既多又健壮。

从不同果汁浓度的效果比较,每种果汁中加10%和15%这2组之间原球茎状体诱导率差异不明显,但从原球茎状体的进一步生长发育结果看,15%组要优于10%组。

### 2.4 接种方式和材料对蝴蝶兰叶片原球茎状体发生的影响

用MS+BA 5 mg/L+椰汁15%培养基进行接种方式和材料的试验(表3),结果表明,外植体接入培养基后不转瓶,2个月后,原球茎状体诱导率为43%,但如果接种后的第一个月,每隔10 d转瓶1次,连续转瓶3

次,接种2个月后,可使原球茎状体诱导率提高到60%以上。接种时,外植体叶块上表面朝下平放培养基上,则原球茎状体诱导率仅为10%左右,且原球茎状体发生部位仅限于叶块切口边缘,每叶块上形成的原球茎状体数量也极少,因此接种时,外植体叶块应上表面朝上平放培养基上。外植体叶片切割后,利于在切口边缘形成原球茎状体,但切块小于0.5 cm×0.5 cm时,叶块易褐变死亡。未切割的整张叶片原球茎状体诱导率约为20%,产生部位多为叶基部伤口处及叶上表面,产生时间比切割组的晚10 d左右。一般幼嫩叶片,生长旺盛的肥厚叶片原球茎状体诱导率高。本实验未观察到叶片的顶部、中部和基部叶块间的诱导率有明显差异。另外,本实验采用花梗侧芽培养的无菌苗和室外盆栽苗的幼叶为实验材料,当叶龄一致时,两种材料之间在原球茎状体诱导率上未见明显差异。

### 2.5 其它影响原球茎状体发生的因素

活性炭3 g/L可有效防止外植体叶块变褐死亡,同时也促进再生植株根的发生和生长。在

表2 果汁对蝴蝶兰叶片原球茎状体产生的影响

Table 2 Effect of fruit juice on PLB formation in *Phalaenopsis*

果汁含量(%) Fruit juice perant(%)	BA (mg/L)	外植体数 No. of explants	产生原球茎状体的 外植体数 No. of explants pro ducing PLB(60 d)	诱导率(%) Induction rate (60 d)
香蕉汁 Banana	10 0	100 86	0 27	0 31.4
果汁 juice	15 5	95 96	31 0	32.6 0
苹果汁 Apple	10 5	92	25	27.1
果汁 juice	15 5	100	26	26
椰子汁 Coconut	10 5	100 90	0 38	0 42.2
果汁 juice	15 5	100	43	43

基本培养基 MS Basic medium MS

表3 继代间隔时间对蝴蝶兰叶片原球茎状体产生的影响

Table 3 Effect of interval of subculture on PLB formation in *Phalaenopsis*

继代间隔 Interval of subculture(d)	外植体数 No. of explants	产生PLB的外植体数 No. of explants producing PLB(60 d)	诱导率(%) Induction rate (60 d)
60	100	43	43
10	98	60	61.1

培养基(Medium):MS+BA 5 mg/L+coconut juice 15%

温度适宜,光强相同的情况下,室内自然散射光比日光灯的光更利于叶片原球茎状体的形成。

### 2.6 外部因子对植株再生和试管苗移栽的影响

原球茎状体产生后 2 个月,肉眼可见原球茎状体顶部具 1~2 个叶原基,此时把原球茎状体转移至 MS 培养基以及附加各种果汁和多效唑(MET)的 MS 培养基中,3 个月后,原球茎状体都能长成具根、茎、叶的小植株。表 4 的结果表明,加果汁的各组植株的每株叶片数、根数、平均根长和整株鲜重都比对照组有明显增加,其中加 15%香蕉汁组的植株长势及统计的各项指标最好。加入 1~2 mg/L 多效唑后,各组植株的根、叶的伸长生长受抑制,与未加多效唑的各组相比,叶片短而肥厚,叶色深绿,每株叶片数变化不大,但根数、根粗增加明显,这种形态上的变化,可以减少植株在移栽时的水分蒸腾,扩大根尖的吸收表面积,有利于试管苗移栽成活。移栽试验结果表明,加入果汁及 MET 组的植株成活率为 95%以上,而未加组的为 80%左右。

## 3 讨 论

蝴蝶兰为单茎性气生兰,植株上极少发生侧枝,组织培养时,以茎尖为外植体会损伤母株,以花梗侧芽为外植体,则取材受开花与否限制,本实验取幼叶为外植体,对母株伤害不大。在本实验条件

表 4 果汁和多效唑对植株再生的影响  
Table 4 Effect of fruit juice and MET on plant regeneration

果汁含量(%) Fruit juice percent	多效唑 MET (mg/L)	叶片数/株 No. of leaves /plant	根数/株 No. of roots /plant	平均根长(cm) Average a root length	鲜重(g)/株 Fresh weight /plant
对照 Control	0	2.8	4.2	3.5	2.3
苹果汁 Apple juice	15	3.0	5.0	4.2	3.0
椰子汁 Coconut juice	15	3.7	5.4	4.0	3.3
香蕉汁 Banana juice	15	4.2	6.1	5.5	3.6
	15	4.1	7.9	3.5	3.5
	15	1.5	4.1	8.1	2.9
	2	4.0	8.3	2.3	3.2

基本培养基 MS Basic medium MS

下,以 MS+BA 5 mg/L+椰汁 15%为诱导培养基,以切成 1 cm×1 cm 的蝴蝶兰幼叶为外植体,接种后的第一个月每 10 d 转瓶 1 次,2 个月后,原球茎状体诱导率可达 60%以上。原球茎状体在 MS+香蕉汁 15%+MET 1~2 mg/L 的培养基中培养,3 个月后可长成健壮小苗,小苗移栽成活率达 95%以上。

以蝴蝶兰叶片为外植体,王怀宇<sup>[2]</sup>用 MS+BA 5 mg/L+NAA 1 mg/L 培养基,PLB 诱导率为 16.7%。张秀清等<sup>[4]</sup>用 MS+BA 3 mg/L 培养基,PLB 诱导率为 20%。以茎尖为外植体,郭达初等<sup>[5]</sup>用 MS+BA 5 mg/L+NAA 1 mg/L+椰汁 5%培养基,PLB 诱导率为 30%。日本 Ken T.,Yong S P.<sup>[3,6]</sup>等人都是以茎尖为外植体,获得 30%左右的 PLB 增殖率。我们的实验以叶片为外植体,培养基中加入较高浓度的椰汁,诱导初期频繁转瓶,保证了充足的营养和生理活性物质供应,减少了有害物质酚的积累,使外植体不易褐变,叶片 PLB 诱导率达 61.1%,这对新引进的蝴蝶兰品种的快速推广是极为重要的。

多效唑(MET)是一种植物生长延缓剂,近年来开始被试用于小麦、水稻、香蕉、猕猴桃、唐菖蒲等植物的组织培养,在适宜的浓度下,MET 对这些植物的组培苗有壮苗和促生根的作用。我们曾把 MET 用于万带兰无菌播种苗的培养,也有同样效果<sup>[7]</sup>。本试验用 1~2 mg/L 的 MET 处理,对蝴蝶兰试管苗的壮苗和促进生根也有明显作用,有效地解决了蝴蝶兰试管苗移栽成活率低的问题。

本实验中由蝴蝶兰叶片诱导形成的原球茎状体(PLB),实际上就是由体细胞诱导形成的

胚状体,也称体细胞胚。这几年来我们对影响蝴蝶兰原球茎状体产生的若干因子进行了较为系统的研究,建立了蝴蝶兰原球茎状体发生的实验体系,这为进一步研究蝴蝶兰体细胞胚的发生机理和调控打下了很重要的研究基础。

### 参考文献:

- [1] 卢思聪. 兰花栽培入门[M]. 北京: 金盾出版社, 1990. 19
- [2] 王怀宇. 蝴蝶兰的快速无性繁殖[J]. 园艺学报, 1989, 16(1): 73~77
- [3] 郭达初, 刘克斌, 柴明良等. 蝴蝶石斛兰、卡特兰、蝴蝶兰离体快速繁殖的研究[J]. 浙江农业学报, 1991, 3(1): 34~38
- [4] 张秀清, 王志武, 王春英等. 蝴蝶兰实生苗原球茎状体诱导研究[J]. 莱阳农学院学报, 1995, 12(1): 44~46
- [5] Ken T, Masahiro M. Micropropagation of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis* by culturing shoot tips of flower stalk buds[J]. *Plant Cell Reports*, 1993, 13(1): 7~11
- [6] Yong S P, Syuuichi K, Atsushi K, et al. Efficient propagation of protocorm-like bodies of *Phalaenopsis* in liquid medium[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1996, 45(1): 79~85
- [7] 杨美纯, 周歧伟, 肖鸿源. 多效唑对万带兰种子幼苗生长发育的影响[A]. 植物生长物质和除草剂研究及应用进展(第一辑), 中国植物生理学会植物生长物质分会、中国植物保护学会杂草学分会编, 中国农业科技出版社, 1998. 93~95

## 欢迎订阅《广西植物》

《广西植物》创刊于1981年,是广西植物研究所与广西植物学会合办的植物学的综合性学术刊物。本刊主要发表系统演化植物学、植物生态学与环境植物学、结构植物学、发育生殖植物学、植物体细胞遗传学与植物细胞工程学、代谢与分子植物学等植物学的分支学科的试验研究论文及简报,同时也选登一些有关广西和其他省区的植物园建设,植物资源开发、利用、保护,引种驯化以及花卉、观赏、绿化植物研究等方面的文章。本刊读者对象主要是从事植物学及农、林、园艺、医药等相近学科有关的科研、教学和技术人员。

本刊所发表的植物新分类群已收载于世界权威出版物《邱园索引》,得到植物学界的承认。本刊除通过中国国际书店向国外发行外,还与世界上15个国家和地区的33个研究单位进行了交换。从1989年以来,先后成为中国科技信息研究所选定的1227种统计用的中文科技期刊及中国科技论文“统计刊源”,《中国生物学文摘》收录并成为其正式引用刊源、中国科学引文数据库来源期刊及统计源、入编《中国学术期刊(光盘版)》、进入中国科技期刊500强行列、入选国家中文核心期刊。

本刊为季刊,6印张,16开本,国内外公开发售。定价6.0元,全年24.0元。全国各地邮局订阅(也可直接向本刊编辑部邮购),邮发代号48-43。

本刊地址:广西桂林市雁山,广西植物研究所《广西植物》编辑部

邮编:541006 联系人:唐成香 电话:0773-3550074